

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representation of the original documents submitted by the applicant.

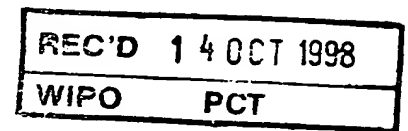
Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

## **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY**

**As rescanning documents *will not* correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.**

**This Page Blank (uspto)**



09/486247  
3/

**Besecheinigung**  
**PRIORITY DOCUMENT**

Die Anmelderin Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts in Heidelberg/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Protease-verwandtes Protein"

am 20. August 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 1. September 1998  
Der Präsident des Deutschen Patentamts  
Im Auftrag

Brand

Aktenzeichen: 197 36 198.6

Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum  
"Protease-verwandtes Protein"  
Unser Zeichen: K 2398 - hu / km

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protease-verwandtes Protein, eine ein solches kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

Eine Haaranomalie ist häufig durch eine gestörte Keratinisierung des Haares bedingt. Aus Untersuchungen mit Nacktmäusen ist bekannt, daß das Genprodukt eines mit whn bezeichneten Gens für die Keratinisierung des Haares wichtig ist. Dieses Genprodukt ist ein Transkriptionsfaktor. Seine Zielgene sind allerdings nicht bekannt. Insofern ist es nicht möglich, in die Keratinisierung des Haares einzugreifen. Dies wäre aber wünschenswert, insbesondere wenn die Keratinisierung des Haares gestört ist.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem die Keratinisierung des Haares untersucht und gegebenenfalls reguliert werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Protease-verwandtes Protein, wobei das Protein die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß das Genprodukt des whn-Gens für die Regulation der Expression von mindestens drei

Genen verantwortlich ist. Zwei dieser Gene kodieren für die bekannten Keratine Ha3 (vgl. Winter, H. et al., Exp. Cell Res. 212 (1994), 190-200) bzw. CK15 (vgl. Nozaki, M. et al., Gene 138 (1994), 197-200). Das dritte Gen kodiert für ein Protein, das Homologien zu einer Protease der Kallikrein-Familie, gegebenenfalls eine Protease-Aktivität aufweist, sich aber von einer bekannten Protease der Kallikrein-Familie auf dem DNA-Level durch Hybridisierung unter üblichen Bedingungen unterscheidet. Ein solches Protein weist die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz auf. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß bei Fehlen des Genprodukts des whn-Gens die Gene von Ha3 und CK15 unter-

In der vorliegenden Erfindung wird vorstehendes Protein mit "Protease-verwandtes Protein" (PVP) bezeichnet.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für ein (PVP) kodierende Nukleinsäure. Dies kann eine RNA oder eine DNA sein. Letztere kann z.B. eine genomische DNA oder eine cDNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- (a) die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,
- (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder
- (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von (a) hybridisiert.

Ein Abschnitt der DNA von Fig. 1 wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) als pRDA2-1a unter DSM 11522 am 23.

April 1997 hinterlegt.

Nachstehend wird eine erfindungsgemäße DNA in Form einer cDNA beschrieben. Diese steht beispielhaft für jede unter die vorliegende Erfindung fallende DNA.

5

Zur Herstellung einer erfindungsgemäßen cDNA ist es günstig, mRNA aus Hautzellen von whn( + / + )- bzw. nu/nu (whn(-/-))-Mäusen zu isolieren, die mRNA in cDNA umzuschreiben und die cDNA einem "Representational Difference Analysis" (RDA)-Verfahren (vgl. Hubank, M. and Schatz, D., Nucleic Acids Research 22 (1994), 5640-5648) zu unterziehen, wodurch jene cDNA identifiziert wird, die in nu/nu-Mäusen im Vergleich zu whn( + / + )-Mäusen unter- bzw. überexprimiert wird. Insbesondere letztere cDNA stellt eine erfindungsgemäße cDNA dar.

10

15

Eine erfindungsgemäße cDNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für E. coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4, anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

20

25

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine, erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende cDNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm Saccharomyces cerevisiae und die tierischen Zellen Ltk<sup>-</sup>, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

30

Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine erfindungsgemäße cDNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße cDNA in Form eines Fu-

sionsproteins exprimiert werden kann.

Desweiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße cDNA exprimierte Protein zu isolieren und zu reinigen. Ein solches Protein, das auch ein Fusionsprotein sein kann, ist somit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, die Keratinisierung des Haares zu untersuchen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (PVP) in Zellen, insbesondere Hautzellen, nachgewiesen werden. Es kann eine Beziehung von (PVP) zur Keratinisierung des Haares hergestellt werden. Ferner kann mit einem erfindungsgemäßen (PVP) ein gegen dieses Protein gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot, einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen. Desweiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, die Expression des für (PVP) kodierenden Gens nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, erfolgen.

Darüberhinaus eignet sich die vorliegende Erfindung, regulierend in die Keratini-

sierung des Haares einzugreifen. Diese Regulierung kann positiver oder negativer Art sein. Als positive Regulierung ist jene zu verstehen, mit der einer gestörten Keratinisierung des Haares begegnet werden kann. Eine negative Regulierung würde vorliegen, wenn eine normale bzw. starke Keratinisierung des Haares abgeschwächt wird.

Für eine positive Regulierung der Keratinisierung des Haares bietet es sich an, (PVP) in Form eines es inhibierenden Stoffes zu verwenden. Dieser Stoff kann ein erfindungsgemäßer Antikörper sein. Ferner kann er ein Anti-Sinn-Oligonukleotid sein, das sich zur Expressions-Inhibierung des für (PVP) kodierenden Gens eignet. Desweiteren kann der Stoff ein solcher sein, der zu (PVP) antagonistisch wirkt. Von Vorteil kann es sein, wenn mehrere der Stoffe verwendet werden. Besonders günstig kann es sein, wenn zusätzlich ein oder mehrere der Proteine Ha3 und CK15 als solche oder in Form von sie exprimierenden Nukleinsäuren verwendet werden.

Für eine negative Regulierung der Keratinisierung des Haares bietet es sich an, (PVP) als solches oder in Form einer es exprimierenden Nukleinsäure zu verwenden. Von Vorteil kann es sein, wenn zusätzlich ein oder mehrere der Proteine Ha3 und CK15 in Form von sie inhibierenden Stoffen verwendet werden. Solche Stoffe können gegen Ha3 bzw. CK15 gerichtete Antikörper oder Anti-Sinn-Oligonukleotide sein, die sich zur Expressions-Inhibierung der für Ha3 bzw. CK15 kodierenden Gene eignen. Auch können die Stoffe solche sein, die antagonistisch zu Ha3 bzw. CK15 wirken.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Mittel, das sich zur Regulierung der Keratinisierung des Haares eignet. Für die Zusammensetzung eines solchen Mittels gelten vorstehende Ausführungen hinsichtlich der positiven und negativen Regulierung der Keratinisierung des Haares entsprechend.

Die vorliegende Erfindung stellt somit einen großen Beitrag zum Verständnis der Keratinisierung des Haares und zu einem möglichen regulierenden Eingreifen dar.



**Kurze Beschreibung der Zeichnung:**

Fig. 1 zeigt die Basensequenz einer erfindungsgemäßen cDNA sowie die davon abgeleitete Aminosäuresequenz eines erfindungsgemäßen (PVP).

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

**Beispiel 1: Herstellung einer erfindungsgemäßen cDNA**

Eine erfindungsgemäße cDNA wurde gemäß des "Representational Difference Analysis" (RDA)-Verfahrens hergestellt. Dieses Verfahren umfaßt die Isolierung von mRNA aus Hautzellen von whn(+ / +)-Mäusen bzw. nu/nu-Mäusen, die Umschreibung der mRNA in cDNA und die Differenzierung der cDNA, wodurch solche identifiziert wird, die in nu/nu-Mäusen unter- bzw. überexprimiert wird. Insbesondere letztere stellt eine erfindungsgemäße cDNA dar.

A) Sequenz der Oligonukleotidadaptoren

Folgende Oligonukleotidadaptorenpaare wurden für die RDA benötigt:

R-Bgl-12: 5'-GATCTGCGGTGA-3'

R-Bgl-24: 5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA-3'

R-Bgl-12: 5'-GATCTGTTTCATG-3'

R-Bgl-24: 5'-ACCGACGTCTGACTATCCATGAACA-3'

N-Bgl-12: 5'-GATCTTCCCTCG-3'

N-Bgl-24: 5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA-3'

B) Herstellung von poly A-mRNA aus den miteinander zu vergleichenden Geweben

5       Zunächst wurde RNA aus der Haut von whn(+ / +)- bzw. nu/nu-Mäusen nach der "Single-Step RNA-Extraction"-Methode (Chomczynski and Sacchi, 1987) gewonnen. Die poly A-mRNA-Fraktionen aus den beiden RNA-Populationen wurden anschließend mit Hilfe von Dynabeads Oligo(dT) nach dem entsprechenden Protokoll der Firma Dynal isoliert.

10       C) Synthese doppelsträngiger cDNA

Zur Synthese von doppelsträngiger whn(+ / +)- bzw. nu/nu-cDNA wurde das "Ribo Clone cDNA Synthesis Kit" der Firma Promega verwendet. Jeweils 4 µg poly A-mRNA wurden eingesetzt, um ungefähr 2 µg cDNA zu erhalten.

15

D) Differenzanalyse

1.       Restriktionsverdau der doppelsträngigen cDNAs

20

a)       Ungefähr 2 µg jeder cDNA wurden in einem 100 µl-Reaktionsansatz mit der Restriktionsendonuklease DpnII 2 h bei 37°C verdaut.

25

b)       Die Reaktionslösungen wurden anschließend zweimal mit einem Phenol/Chloroform-Gemisch (1:1) und einmal mit 100%igem Chloroform extrahiert.

30

c)       Die in den wäßrigen Phasen der beiden Reaktionsansätze enthaltene DNA wurde jeweils mit 2 µg Glykogen, 50 µl 10 M Ammoniumacetat und 650 µl 100% Ethanol versetzt und 20 min auf Eis gefällt.

Nach 14-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14000 upm wurde

der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung der alkoholischen Phase wurde die getrocknete DNA in 20  $\mu$ l TE-Puffer resuspendiert.

5

## 2. Ligation der cDNAs an das R-Bgl-Oligonukleotidadaptorenpaar

a) In einem Reaktionsgefäß wurden vereinigt:

20  $\mu$ l geschnittene cDNA (gesamter Reaktionsansatz aus Punkt D)1c)

8  $\mu$ g R-Bgl-24

4  $\mu$ g R-Bgl-12

6  $\mu$ l 10 x Ligase Puffer

x  $\mu$ l Wasser

10

15

57  $\mu$ l Endvolumen

b) Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler (Peltier Thermocycler PTC-200, MJ Research) auf 50°C erhitzt, 1 min auf dieser Temperatur gehalten und dann im Laufe einer Stunde wieder auf 10°C abgekühlt (ramp rate: 0,1°C/9 sec).

20

c) Nach Hinzufügen von 3  $\mu$ l T4 DNA Ligase (1 U/ $\mu$ l) wurde das Gemisch über Nacht bei 16°C inkubiert.

25

## 3. Synthese von "Repräsentationen" der miteinander zu vergleichenden cDNA-Populationen

a) Zur Generierung sog. "Repräsentationen" der ligierten cDNAs wurde zunächst das Volumen der Ligationsansätze aus Punkt 2c) durch Zugabe von jeweils 140  $\mu$ l Wasser auf 200  $\mu$ l ergänzt.

30

Aus dieser verdünnten Lösung wurden dann pro cDNA-Population

(whn(+ / +)- bzw. nu/nu-Haut) 30 Reaktionen zu jeweils 200  $\mu$ l angesetzt.

Einem solchen Ansatz wurden der Reihe nach folgende Reaktanden zugegeben:

143  $\mu$ l Wasser  
20  $\mu$ l 10x PCR-Puffer  
20  $\mu$ l 2 mM dNTPs  
10  $\mu$ l 25 mM Mg-Chlorid  
2  $\mu$ l R-Bgl-24 (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)  
4  $\mu$ l verdünnter Ligationsansatz

b) PCR:

3 min: 72°C

Hinzufügen von 1  $\mu$ l Taq-DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)

20 x: 5 min: 95°C

3 min: 72°C

zuletzt: Abkühlen auf 4°C.

c) Zur Aufbereitung der Reaktionslösungen wurden jeweils 4 Reaktionsansätze in einem Gefäß vereinigt.

Extraktion: 2 x mit jeweils 700  $\mu$ l Phenol/Chloroform (1:1), 1 x mit Chloroform 100%;

Fällung: Zugabe von 75  $\mu$ l 3 M Na-Acetatlösung (pH 5,3) und 800  $\mu$ l 2-Propanol zu jedem Reaktionsgefäß, 20 min Eis.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70% und Resuspension in soviel Wasser, daß eine Konzentration von 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l resultierte.

#### 4. Restriktionsverdau der "Repräsentationen"

- a) Zur Entfernung der R-Bgl-Oligonukleotidadaptoren wurden 300  $\mu\text{g}$  jeder Repräsentation (whn(+ / +)-Haut bzw. nu/nu-Haut) einem Restriktionsverdau unterzogen. Es wurde nach Zugabe der folgenden Reaktanden 4 h bei 37°C inkubiert:

600  $\mu\text{l}$  cDNA-Repräsentation (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

140  $\mu\text{l}$  10 x DpnII-Puffer

100  $\mu\text{l}$  DpnII (10 U/ $\mu\text{l}$ )

560  $\mu\text{l}$  Wasser.

- b) Der Restriktionsverdau-Ansatz wurde vor dessen Aufbereitung auf 2 Gefäße aufgeteilt.

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%;

Fällung: Zugabe von 70  $\mu\text{l}$  3 M Na-Acetat (pH 5,3), 700  $\mu\text{l}$  2-Propanol zu jedem Gefäß, 20 min Eis;

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70% und Resuspension in soviel Wasser, daß eine Konzentration von 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  resultierte.

Die so erhaltene, DpnII-verdaute whn(+ / +)-Haut-cDNA-Repräsentation stellte die in der subtraktiven Hybridisierung einzusetzende Driver-DNA-Population dar.

#### 5. Synthese der Tester-DNA-Population

- a) 20  $\mu\text{g}$  der mit DpnII verdauten nu/nu-Haut-cDNA-Repräsentation (= Tester-DNA) wurden in einem TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt:

40  $\mu\text{l}$  Tester-DNA (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

50  $\mu\text{l}$  Te-Puffer

10  $\mu\text{l}$  10 x Loading Buffer

wurden auf ein 1,2% Agarose-TAE-Gel aufgetragen. Es wurde solange Spannung an das Gel gelegt, bis die Bromphenolblau-Komponente des Loading Buffers ungefähr 2 cm weit gewandert war.

- 5            b)    Anschließend wurden die Repräsentations-DNA enthaltenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des "Agarose Gel DNA Extraction Kits" der Firma Boehringer Mannheim eluiert.

10           Die DNA-Extrakte wurden vereinigt, so daß insgesamt 60  $\mu$ l Lösung erhalten wurden. Die Konzentration dieser Lösung wurde durch Elektrophorese von 5  $\mu$ l in einem 1% Agarose-Gel abgeschätzt.

- 15           c)    Zuletzt erfolgte eine Ligation der Tester-DNA mit dem J-Oligonukleotid-Paar:

2  $\mu$ g Tester-DNA-Eluat  
6  $\mu$ l 10 x Ligase Puffer  
4  $\mu$ l J-Bgl-24 (2  $\mu$ g/ $\mu$ l)  
4  $\mu$ l J-Bgl-12 (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)  
x  $\mu$ l Wasser  
20           57  $\mu$ l Endvolumen

- 25           d)    Überführung des Reaktionsansatzes in Thermocycler:  
1 min: 50°C  
Abkühlen auf 10°C in 1 h (ramp rate: 0,1°C/9 sec).

- 25           e)    Nach Hinzufügen von 3  $\mu$ l T4 DNA Ligase (1 U/ $\mu$ l) Inkubation bei 16°C über Nacht.

- 30           f)    Einstellung der Konzentration der Tester-DNA auf ungefähr 10 ng/ $\mu$ l durch Zugabe von 120  $\mu$ l Wasser.

## 6. Subtraktive Hybridisierung

a) 80  $\mu$ l Driver-DNA (40  $\mu$ g) aus Schritt 4. und 40  $\mu$ l (0,4  $\mu$ g) verdünnte, mit J-Oligonukleotiden ligierte Tester-DNA aus Schritt 5. wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt und 2 x mit Phenol/-Chloroform (1:1) und einmal mit Chloroform 100% extrahiert.

b) Fällung durch Zugabe von 30  $\mu$ l 10 M Ammoniumacetat, 380  $\mu$ l Ethanol 100%; 10 min -70°C.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Anschließend: 2 x Waschen des Pellets mit Ethanol 70%, kurze Zentrifugation nach jedem Waschschrift; Trocknen des DNA-Pellets.

c) Die Resuspension der DNA erfolgte in 4  $\mu$ l EE x3-Puffer (30 mM EPPS, pH 8,0 bei 20°C (Firma Sigma), 3 mM EDTA) - hierbei wurde ungefähr 2 min auf- und abpipettiert, dann 5 min auf 37°C erwärmt, kurz "gevortext" und zuletzt die Lösung durch Zentrifugieren wieder am Gefäßboden vereinigt. Zuletzt wurde die Lösung mit 35  $\mu$ l Mineralöl überschichtet.

d) Überführen des Reaktionsansatzes in Thermocycler:

5 min: 98°C,

Abkühlen auf 67°C und sofortige Zugabe von 1  $\mu$ l 5 M NaCl zur DNA,

20 h Inkubation bei 67°C.

## 7. Synthese des ersten Differenzprodukts

a) Nachdem das Mineralöl möglichst vollständig entfernt worden war, wurde die DNA schrittweise verdünnt:

1. Zugabe von 8  $\mu$ l TE (+ 5  $\mu$ g/ $\mu$ l Hefe-RNA),

2. Zugabe von 25  $\mu$ l TE - danach gründliches Mischen,
3. Zugabe von 362  $\mu$ l TE - Vortex.

- b) Für jede subtraktive Hybridisierung wurden 4 PCRs angesetzt. Pro Reaktion:

127  $\mu$ l Wasser

20  $\mu$ l 10 x Puffer

20  $\mu$ l 2 mM dNTPs

5  $\mu$ l 25 mM Mg-Chlorid

20  $\mu$ l verdünnte Hybridisierungslösung (aus Schritt 7a))

- c) PCR-Programm:

3 min: 72°C

Zugabe von 1  $\mu$ l Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)

5 min: 72°C

Zugabe von 2  $\mu$ l Primer J-Bgl-24 (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)

10 x: 1 min: 95°C

3 min: 70°C

zuletzt: 10 min: 72°C; dann Abkühlen auf Raumtemperatur.

- d) Die 4 Reaktionsansätze wurden in einem 1,5 ml-Gefäß vereinigt.

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%.

Nach Zugabe von 2  $\mu$ g Glykogen Carrier:

Fällung mit 75  $\mu$ l 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 800  $\mu$ l 2-Propanol, 20 min Eis.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70%.

Nach Trocknen der DNA Resuspension in 40  $\mu$ l Wasser.

- e) 20  $\mu$ l der resuspendierten DNA aus d) wurden einem "Mung Bean Nuclease-Verdau" (= MBN) unterzogen:

20  $\mu$ l DNA



4  $\mu$ l 10 x Mung Bean Nuclease Buffer (Fa. NEB)  
14  $\mu$ l Wasser  
2  $\mu$ l Mung Bean Nuclease (10 U/ $\mu$ l; Fa. NEB)  
35 min, 30°C.

5

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 160  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl (pH 8,9) und 5-minütige Inkubation bei 98°C abgebrochen. Anschließend wurde das Gefäß bis zum nächsten Schritt auf Eis gesetzt.

10

- f) Während der MBN-Inkubation wurden 4 weitere PCRs angesetzt (auf Eis):

127  $\mu$ l Wasser  
20  $\mu$ l 2 mM dNTPs  
10  $\mu$ l 25 mM Mg-Chlorid  
2  $\mu$ l J-Bgl-24 (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)  
20  $\mu$ l MBN-verdaute DNA.

15

- g) PCR-Programm:

1 min: 95°C

20

Abkühlenlassen auf 80°C, Zugabe von 1  $\mu$ l Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l),

18 x: 1 min: 95°C

3 min: 70°C,

zuletzt: 10 min: 72°C; Abkühlenlassen auf 4°C.

25

- h) Die 4 PCR-Ansätze wurden in einem Gefäß vereinigt.

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%.

Fällung: 75  $\mu$ l 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 800  $\mu$ l 2-Propanol, 20 min Eis.

30

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70%.

Resuspension der DNA in 100  $\mu$ l Wasser (resultierende Konzen-

tration: 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ); die auf diese Weise erhaltene Lösung stellte das erste Differenzprodukt dar.

8. Austausch der Oligonukleotidadaptoren des Differenzprodukts

5

- a) Entfernung der Oligonukleotidadaptoren durch Restriktionsverdau mit DpnII:

40  $\mu\text{l}$  Differenzprodukt 1 (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

30  $\mu\text{l}$  10 x DpnII Puffer

10

15  $\mu\text{l}$  DpnII (10 U/ $\mu\text{l}$ )

215  $\mu\text{l}$  Wasser

2 h 37°C.

15

- b) Aufarbeitung des Reaktionsansatzes:

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%.

Fällung: 33  $\mu\text{l}$  3 M Na-Acetat (pH 5,3), 800  $\mu\text{l}$  Ethanol 100%,  
20 min -20°C.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

20

Waschen des Pellets in Ethanol 70% und Resuspension in 40  $\mu\text{l}$  Wasser.

- c) Ligation des Differenzprodukts an N-Bgl-Oligonukleotidadaptoren-paar

25

1  $\mu\text{l}$  der aufgearbeiteten DNA-Lösung aus Schritt b) wurde mit 9  $\mu\text{l}$  Wasser zu einer Konzentration von 50 ng/ $\mu\text{l}$  verdünnt; 4  $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden in folgender Reaktion eingesetzt:

4  $\mu\text{l}$  DpnII verdautes Differenzprodukt 1 (200 ng)

6  $\mu\text{l}$  10 x Ligase Puffer

30

2,5  $\mu\text{l}$  N-Bgl-24 (3,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

2  $\mu\text{l}$  N-Bgl-12 (2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

42,5  $\mu\text{l}$  Wasser.

- d) Nach Überführen des Reaktionsansatzes in Thermocycler:  
1 min: 50°C,  
Abkühlenlassen innerhalb einer Stunde auf 10°C (ramp rate:  
0,1°C/9 sec).

5

- e) Nach Hinzugeben von 3 µl T4 DNA Ligase (1 µl/µl), Inkubation bei  
16°C über Nacht.

9. Synthese des 2. Differenzprodukts

10

Der Ligationansatz aus Schritt 8e) wurde durch Zugabe von 100 µl Wasser auf eine Konzentration von 1,25 ng/µl verdünnt. 40 µl dieser Verdünnung (50 ng) wurden mit 80 µl Driver-DNA (siehe Punkt 4.) gemischt und erneut gemäß den Schritten 6. bis 8. behandelt. Beim Wechsel der Oligonukleotidadaptoren (Schritt 8.) wurden dieses Mal die J-Bgl-Oligonukleotide an das neu entstandene Differenzprodukt 2 ligiert.

15

10. Synthese des 3. Differenzprodukts

20

Die Konzentration des mit den J-Bgl-Oligos ligierten Differenzprodukts 2 wurde auf eine Konzentration von 1 ng/µl reduziert. 10 µl dieser Lösung wurden wiederum mit 990 µl Wasser (+ 30 µg Hefe-RNA) verdünnt, so daß die Konzentration nunmehr 10 pg/µl betrug. Die subtraktive Hybridisierung wurde mit 100 pg (10 µl) J-ligiertem Differenzprodukt 2 und 40 µg (80 µl) Driver-DNA aus Schritt 4.) durchgeführt. Ansonsten wurde wie beim 1. und 2. Differenzprodukt nach den Schritten 6. bis 8. vorgegangen. Eine Ausnahme bildete die PCR nach der MBN-Reaktion (Punkt 7.g) - hier wurden nur 18 statt 22 Cycles durchgeführt.

25

30

11. Klonierung des 3. Differenzprodukts

Das 3. Differenzprodukt wurde zunächst einem Restriktionsverdau mit

DpnII unterzogen, wodurch die Oligonukleotidadaptoren entfernt wurden. Das Reaktionsprodukt wurde anschließend auf ein TAE-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die getrennten DNA-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA eluiert und in einen mit BamHI geschnittenen Vektor (pBS Not) kloniert.

## 12. Charakterisierung der Differenzprodukte

Um zu bestätigen, daß es sich bei den klonierten DNA-Fragmenten nicht um Methodenartefakte handelte, sondern um Sequenzen, die tatsächlich in den untersuchten DNA-Repräsentationen enthalten waren, wurden Southern Analysen durchgeführt, bei denen die untersuchten cDNA-Repräsentationen mit den radioaktiv markierten Klonierungsprodukten hybridisiert wurden.

Anschließend wurden diejenigen DNA-Fragmente, die sich in der Southern Analyse als "echte" Differenzprodukte erwiesen hatten, mittels Northern Hybridisierungen untersucht: es wurden RNAs aus den untersuchten Geweben (whn(+/+)-Haut-cDNA und nu/nu-Haut-cDNA) geblottet und mit den radioaktiv markierten Klonierungsprodukten hybridisiert. Hierdurch wurde die differentielle Expression dieser Sequenzen in den untersuchten Geweben bestätigt. Eine Analyse der Sequenzen ergab die erfindungsgemäße cDNA von Fig. 1.

## Beispiel 2: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen (PVP)

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen (PVP) wird der Vektor pBSNot-PVP von Beispiel 1 mit BamHI gespalten, die für (PVP) kodierende DNA isoliert und in den mit BamHI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Quiagen) inseriert. Es wird das Expressionsplasmid pQ/PVP erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungs-

gemäßen (PVP) von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQ/PVP wird zur Transformation von E.coli SG 13009(vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin und 25µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wird eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wird mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Quiagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wird in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wird das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

So kann ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden.

### Beispiel 3: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 wird einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine ca. 25 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein werden Tiere wie folgt immunisiert:

### Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung werden 35µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag O: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)  
Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)  
Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)  
Tag 80: Ausbluten

5

10

15

20

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wird wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen mehrere Waschschrritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400µM Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

So können erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden.

#### Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

25

Pro Immunisierung werden 40µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

30

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)  
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)  
Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden so erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

#### **Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus**

5

Pro Immunisierung werden 12 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung war das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

- |    |         |   |
|----|---------|---|
| 10 | Tag 0.  | 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)         |
|    | Tag 28: | 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA) |
|    | Tag 56: | 3. Immunisierung (icFA)                                 |
|    | Tag 84: | 4. Immunisierung (PBS)                                  |
|    | Tag 87: | Fusion  |

15

Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper werden so nachgewiesen.

### Patentansprüche

1. Protease-verwandtes Protein, wobei das Protein die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt.  
5
2. DNA, kodierend für ein Protein nach Anspruch 1, wobei die DNA umfaßt:
  - (a) die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,
  - 10 (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA oder
  - (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
3. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 2.  
15
4. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 3.
5. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 4 unter geeigneten Bedingungen.  
20
6. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 1.
7. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 und der DNA nach Anspruch 2 sowie des Antikörpers nach Anspruch 6 zum Nachweis der Keratinisierung des Haares.  
25
8. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 zur negativen Regulierung der Keratinisierung des Haares.  
30
9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei das Protein als solches oder in Form einer es exprimierenden Nukleinsäure vorliegt.



10. Verwendung nach Anspruch 8 oder 9, wobei ferner Stoffe eingesetzt werden, welche die Proteine Ha3 und/oder CK15 inhibieren.
- 5 11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei die Stoffe gegen Ha3 bzw. CK15 gerichtete Antikörper und/oder Anti-Sinn-Oligonukleotide sind, welche die Expression der diese Proteine kodierenden Nukleinsäuren inhibierenden.
12. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 zur positiven Regulierung der Keratinisierung des Haares.
- 10 13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei das Protein in Form eines es inhibierenden Stoffes vorliegt.
- 15 14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei der Stoff ein Antikörper nach Anspruch 6 und/oder ein Anti-Sinn-Oligonukleotid ist, das die Expression der das Protein kodierenden Nukleinsäure inhibiert.
- 20 15. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei ferner die Proteine Ha3 und/oder CK15 als solche oder in Form von sie exprimierenden Nukleinsäuren vorliegen.

K 2398

### **Zusammenfassung**

5

#### **Protease-verwandtes Protein**

10

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protease-verwandtes Protein, eine ein solches kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper und antagonistische Substanzen.

15

5'- TAG GTG GTG TCA TTC CCC TCC AAC CTG AGT GCT GGC AGG TAC 42

						<b>M</b>	<b>P</b>	<b>M</b>	<b>K</b>	<b>M</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>M</b>	<b>8</b>
<b>ACT</b>	<b>GCT</b>	<b>GGC</b>	<b>CAC</b>	<b>CAG</b>	<b>CAG</b>	<b>ATG</b>	<b>CCC</b>	<b>ATG</b>	<b>AAG</b>	<b>ATG</b>	<b>CTG</b>	<b>ACA</b>	<b>ATG</b>	<b>84</b>

K	M	L	A	L	C	L	V	L	A	K	S	A	W	22
AAG	ATG	CTG	GCC	CTG	TGC	TTG	GTT	CTT	GCT	AAA	TCA	GCC	TGG	126

S	E	E	Q	E	K	V	V	H	G	G	P	C	L	36
TCG	GAG	GAA	CAG	GAG	AAG	GTG	GTT	CAT	GGA	GGC	CCG	TGT	TTG	168

<b>K</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>H</b>	<b>P</b>	<b>F</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>Y</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	50
AAG	GAC	TCC	CAC	CCT	TTC	CAG	GCT	GCC	CTC	TAC	ACC	TCA	GGT	210

H	L	L	C	G	G	V	L	I	D	P	Q	W	V	64
CAC	TTG	CTG	TGT	GGT	GGG	GTC	CTC	ATT	GAC	CCA	CAG	TGG	GTG	252

L	T	A	A	H	C	K	K	P	N	L	Q	V	I	78
CTG	ACA	GCT	GCC	CAC	TGC	AAA	AAA	CCG	AAT	CTG	CAG	GTG	ATC	294

L	G	K	H	N	L	R	Q	T	E	T	F	Q	R	92
TTG	GGG	AAA	CAC	AAC	CTA	CGG	CAA	ACA	GAG	ACT	TTC	CAA	AGG	336

Q	I	S	V	D	R	T	I	V	H	P	R	Y	N	106
CAA	ATC	TCA	GTG	GAC	AGG	ACT	ATT	GTC	CAT	CCC	CGC	TAC	AAC	378

P	E	T	H	D	N	D	I	M	M	V	H	L	K	120
CCT	GAA	ACC	CAC	GAC	AAT	GAC	ATC	ATG	ATG	GTG	CAT	CTG	AAA	420

<b>N</b>	<b>P</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>K</b>	<b>I</b>	<b>Q</b>	<b>P</b>	<b>L</b>	<b>P</b>	<b>L</b>	134
AAT	CCA	GTC	AAA	TTC	TCT	AAA	AAG	ATC	CAG	CCT	CTG	CCC	TTG	462

K	N	D	C	S	E	E	N	P	N	C	Q	I	L	148
AAG	AAT	GAC	TGC	TCT	GAG	GAG	AAT	CCC	AAC	TGC	CAG	ATC	CTG	504

<b>G</b>	<b>W</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>M</b>	<b>E</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>F</b>	<b>P</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	162
GGC	TGG	GGC	AAG	ATG	GAA	AAT	GGT	GAC	TTC	CCA<	GAT	ACC	ATT	546

Q	C	A	D	V	H	L	V	P	R	E	Q	C	E	176
CAG	TGT	GCT	GAT	GTC	CAT	CTG	GTG	CCC	CGG	GAG	CAG	TGT	GAG	588

R	A	Y	P	G	K	I	T	Q	S	M	V	C	A	190
CGT	GCC	TAC	CCT	GGC	AAG	ATC	ACC	CAG	AGC	ATG	GTG	TGC	GCA	630

<b>G</b>	<b>D</b>	<b>M</b>	<b>K</b>	<b>E</b>	<b>G</b>	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>C</b>	<b>Q</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	204
GGC	GAC	ATG	AAA	GAA	GGC	AAC	GAT	TCC	TGT	CAG	GGT	GAT	TCT	672

<b>G</b>	<b>G</b>	<b>P</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	<b>G</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	218
GGA	GGT	CCC	CTA	GTA	TGT	GGG	GGT	CGC	CTC	CGA	GGG	CTC	GTG	714

Fig. 1

Fortsetzung von Fig. 1

S	W	G	D	M	P	C	G	S	K	E	K	P	G	232
TCA	TGG	GGT	GAC	ATG	CCC	TGT	GGA	TCA	AAG	GAG	AAG	CCA	GGA	756
V	Y	T	D	V	C	T	H	I	R	W	I	Q	N	246
GTT	TAC	ACC	GAT	GTC	TGC	ACT	CAT	ATC	AGA	TGG	ATC	CAA	AAC	798
I	L	R	N	K	W	L								253
ATC	CTC	AGA	AAC	AAG	TGG	CTG	TGA	-3'						840

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference  
(if desired) (12 characters maximum)

K 2585

Box No. I TITLE OF INVENTION

Protease-Related Protein

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Deutsches Krebsforschungszentrum  
Stiftung des öffentlichen Rechts  
Im Neuenheimer Feld 280  
69120 Heidelberg

☐ This person is also inventor.

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

State (i.e. country) of nationality:

DE

State (i.e. country) of residence:

DE

This person is applicant  
for the purposes of:

☐ all designated  
States.

☒ all designated States except  
the United States of America

☐ the United States  
of America only

☐ the States indicated in  
the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

DEAR, Terence N.  
Wundstr. 31  
69123 Heidelberg

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box  
is marked, do not fill in below.)

State (i.e. country) of nationality:

GB

State (i.e. country) of residence:

DE

This person is applicant  
for the purposes of:

☐ all designated  
States

☐ all designated States except  
the United States of America

☒ the United States  
of America only

☐ the States indicated in  
the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf  
of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent

☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Dr. Andrea Schübler  
HUBER & SCHÜSSLER  
Patentanwälte · Patent Attorneys  
Truderinger Straße 246 · 81825 München  
Tel. 089/42 72 47 48 · Fax 089/42 72 47 49

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

☐ Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

**This Page Blank (uspto)**

## Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

*If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request.*

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

BOEHM, Thomas  
Lucas-Cranach-Str.4  
69126 Heidelberg

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

State (i.e. country) of nationality:

DE

State (i.e. country) of residence:

DE

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☒ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

This person is:

☐ applicant only

☐ applicant and inventor

☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

State (i.e. country) of nationality:

State (i.e. country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

This person is:

☐ applicant only

☐ applicant and inventor

☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

State (i.e. country) of nationality:

State (i.e. country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

This person is:

☐ applicant only

☐ applicant and inventor

☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

State (i.e. country) of nationality:

State (i.e. country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

**This Page Blank (uspto)**



Box No.V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☐ AP ARIPO Patent: KE Kenya, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swaziland and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ EP European Patent: AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☐ OA OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AM Armenia                               | <input type="checkbox"/> MD Republic of Moldova                 |
| <input type="checkbox"/> AT Austria                               | <input type="checkbox"/> MG Madagascar                          |
| <input type="checkbox"/> AU Australia                             | <input type="checkbox"/> MN Mongolia                            |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados                              | <input type="checkbox"/> MW Malawi                              |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgaria                              | <input type="checkbox"/> MX Mexico                              |
| <input type="checkbox"/> BR Brazil                                | <input type="checkbox"/> NL Netherlands                         |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus                               | <input type="checkbox"/> NO Norway                              |
| <input type="checkbox"/> CA Canada                                | <input type="checkbox"/> NZ New Zealand                         |
| <input type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein  | <input type="checkbox"/> PL Poland                              |
| <input type="checkbox"/> CN China                                 | <input type="checkbox"/> PT Portugal                            |
| <input type="checkbox"/> CZ Czech Republic                        | <input type="checkbox"/> RO Romania                             |
| <input type="checkbox"/> DE Germany                               | <input type="checkbox"/> RU Russian Federation                  |
| <input type="checkbox"/> DK Denmark                               | <input type="checkbox"/> SD Sudan                               |
| <input type="checkbox"/> EE Estonia                               | <input type="checkbox"/> SE Sweden                              |
| <input type="checkbox"/> ES Spain                                 | <input type="checkbox"/> SI Slovenia                            |
| <input type="checkbox"/> FI Finland                               | <input type="checkbox"/> SK Slovakia                            |
| <input type="checkbox"/> GB United Kingdom                        | <input type="checkbox"/> TJ Tajikistan                          |
| <input type="checkbox"/> GE Georgia                               | <input type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago                 |
| <input type="checkbox"/> HU Hungary                               | <input type="checkbox"/> UA Ukraine                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan                      | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya                                 |   |
| <input type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan                            | <input type="checkbox"/> UZ Uzbekistan                          |
| <input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam                            |
| <input type="checkbox"/> KR Republic of Korea                     |   |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan                            |   |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka                             |   |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia                               |   |
| <input type="checkbox"/> LT Lithuania                             |   |
| <input type="checkbox"/> LU Luxembourg                            |   |
| <input type="checkbox"/> LV Latvia                                |   |

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except the designation(s) of \_\_\_\_\_.

The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

This Page Blank (uspto)

## Box No. VI PRIORITY CLAIM

Further priority claims are indicated in the Supplemental Box ☐

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Country (in which, or for which, the application was filed)	Filing Date (day/month/year)	Application No.	Office of filing (only for regional or international application)
item (1) Germany	August 20, 1997	197 36 198.6	
item (2)			
item (3)			

Mark the following check-box if the certified copy of the earlier application is to be issued by the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office (a fee may be required):

☐ The receiving Office is hereby requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s) : \_\_\_\_\_

## Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used): ISA / EPA

Earlier search Fill in where a search (international, international-type or other) by the International Searching Authority has already been carried out or requested and the Authority is now requested to base the international search, to the extent possible, on the results of that earlier search. Identify such search or request either by reference to the relevant application (or the translation thereof) or by reference to the search request:

Country (or regional Office): \_\_\_\_\_ Date (day/month/year): \_\_\_\_\_ Number: \_\_\_\_\_

## Box No. VIII CHECK LIST

This international application contains the following number of sheets:

1. request : 4 sheets  
 2. description : 20 sheets  
 3. claims : 2 sheets  
 4. abstract : 1 sheets  
 5. drawings : 2 sheets

Total : 29 sheets

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

1. ☐ separate signed power of attorney  
 2. ☐ copy of general power of attorney  
 3. ☐ statement explaining lack of signature  
 4. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):  
 5. ☒ fee calculation sheet  
 6. ☐ separate indications concerning deposited microorganisms  
 7. ☐ nucleotide and/or amino acid sequence listing (diskette)  
 8. ☒ other (specify): cheque

Figure No. \_\_\_\_\_ of the drawings (if any) should accompany the abstract when it is published.

## Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Dr. Andrea Schübler

München, Aug. 12, 1998

  
 European Patent Attorney

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings:  <input type="checkbox"/> received:  <input type="checkbox"/> not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority specified by the applicant: ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

**This Page Blank (uspto)**